

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИМ БЕЛКАМ ГРУППЫ S-100 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ МЕНИНГИТАМИ И МЕНИНГОЭНЦЕФАЛИТАМИ

Витебский Государственный медицинский университет, Витебский филиал НИКИ радиационной медицины и эндокринологии

Головной мозг относится к “забарьерным органам иммунитета” (А.С. Шевелев 1984). В условиях повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера нейроспецифические белки (НСБ) могут попадать в общее кровеносное русло. Наиболее часто в индукции аутоиммунных реакций участвуют такие НСБ, как белки группы S-100. В последние годы отмечается возросший интерес к изучению антител к белкам группы S-100 (АТ-S-100). Учитывая уникальность этих белков для нервной ткани, способность АТ-S-100 проникать через ГЭБ, накапливаться в ткани мозга, вызывать деструктивные изменения в клетках глии, стандартность получения и малую изученность нами были изучены закономерности циркуляции АТ-S-100 при острых менингитах и менингоэнцефалитах в динамике заболевания.

Выделение нейроспецифических белков группы S-100 проводили из головного мозга по стандартной методике, описанной А.Б. Полетаевым [1]. Белки главной фракции S-100 элюировались в виде 4 основных фракций. Методом ИФА изучали антигенную активность полученных фракций белков группы S-100.

Учитывая отсутствие коммерческих тест-систем по определению антител к нейроспецифическим белкам группы S-100, нами был разработан экспериментальный иммуноферментный набор для определения АТ-S-100. Полистироловые планшеты для ИФА (“Nunc”, Дания; “Dynatech”, Швейцария) сенсibilизировали полученными растворами отдельных фракций белков группы S-100 в 0,1 М фосфатном буфере рН 8,0 в концентрации 5-7 мкг/мл. Для сенсibilизации были взяты 1, 2, 3, 4 фракции выхода белков S-100. Планшеты инкубировали 12 часов при +4°C. После этого в каждую лунку вносили по 10 мкл 1% раствора бычьего сывороточного альбумина, инкубировали 2 часа при +37°C. Затем вносили сы-

воротки исследуемых больных и здоровых лиц, разведенные 1:100. Инкубировали 2 часа при +37°C. После этого в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата – антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (фирма “Им-Био”, Нижний Новгород) и инкубировали 2 часа при +37°C. Для проявления реакции в каждую лунку вносили по 0,1 мл субстрата следующего состава: 5 мг ортофенилдиамина, 10 мл 0,1М цитратного буферного раствора рН 4,5, содержащего 0,3% перекись водорода. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 5% раствора серной кислоты. Определение оптической плотности проводили фотометрически при длине волны 492 нм на приборе АИФ-М/340 (НПО “Витязь”, г. Витебск).

В качестве позитивного контроля использовали сыворотки крови больных с деструктивным процессом в головном мозге. Согласно данным литературы, белки S-100 являются маркером повреждения клеток мозга, в том числе и при менингитах и энцефалитах [2,3, 4, 5]. Так у больного М., история болезни № 2849/97, умершего от вирусного менингоэнцефалита неуточненной этиологии, на аутопсии обнаружены обширные очаги кваликационного некроза в веществе головного мозга, очаги демиелинизации. Деструктивный процесс в головном мозге также был подтвержден высокими значениями маркера повреждения нейронов – нейроспецифической енолазы (НСЕ) в СМЖ и сыворотке крови. В динамике заболевания уровень НСЕ в СМЖ составил 10,21 и 35,27 нг/мл (норма $2,68 \pm 1,36$ нг/мл), в сыворотке крови – 22,62 и 31,54 нг/мл (норма $13,05 \pm 1,06$ нг/мл).

Результаты ИФА считали положительными, если оптическая плотность исследуемого образца в 2,0 и более раза превышала среднее значение оптической плотности негативного контроля. Для сравнительного анализа в качестве контрольных были использованы сыворотки крови доноров (n=270).

Отношение среднего значения оптической плотности в лунках с позитивным контролем к среднему значению оптической плотности в лунках с негативным контролем должно было быть не менее 5,0.

Для изучения антигенной активности полученных фракций белков группы S-100 мы исследовали полученные белки с одними и теми же сыворотками больных (табл. 1).

Наибольшая антигенная активность выявлена нами во фракциях белков S-100, элюируе-

мых с анионообменного носителя при 0,1М, 0,25М, 0,5М NaCl (2, 3, 4 фракции соответственно), из них – максимальная при 0,1М NaCl (фракция №2).

В дальнейшем в работе мы использовали фракцию белков S-100, элюируемую при 0,1М NaCl. В качестве позитивного контроля использовали сыворотки крови больного М., умершего от ВМЭ. Постановку реакции с каждой из проб дублировали и учитывали средний результат. Высокая воспроизводимость результатов в дублях и практически полное отсутствие неспецифического связывания указывают на то, что разработанный нами экспериментальный набор обладает необходимой чувствительностью для определения антител к белкам S-100 в сыворотке крови. Свободно циркулирующие АТ-S-100 в крови выявлялись у 1,5% здоровых людей – безвозмездных доноров крови.

Нами исследованы с помощью метода ИФА сыворотки крови 118 больных острыми бактериальными менингитами (ОБМ), вирусными менингитами (ВМ), вирусными менингоэнцефалитами и энцефалитами (ВМЭ/ВЭ). В сравнении со здоровыми лицами среди больных среднетяжелыми и тяжелыми формами ОБМ лицами частота выявления АТ-S-100 была выше и в острый период, и в период реконвалесценции. При тяжелых формах ОБМ отмечалась тенденция к увеличению частоты АТ-S-100 в периоде реконвалесценции (табл.1).

Таблица 1

Частота выявления АТ-S-100 в сыворотке крови у больных ОБМ, ВМ, ВМЭ (в %)

Этиология	Тяжесть	Острый период	Период реконвалесценции
Контроль	1,5±0,74%		
ОБМ	средне-тяжелая	16,67±9,04* n=18	20,0±10,69* n=15
ОБМ	тяжелая	25,6±6,99* n=39	45,0±7,87* n=40
ВМ	средне-тяжелая	25,0±10,83* n=16	23,1±12,17* n=13
ВМ	тяжелая	16,7±15,23 n=6	40,0±24,49* n=5
ВМЭ	средне-тяжелая	14,3±14,29 n=7	40,0±24,49* n=5
ВМЭ	тяжелая	29,2±9,48* n=24	35,3±11,95* n=17

Примечание. * – достоверность различий показателя в сравнении с контрольной группой $P < 0,05$

Следовательно, при ОБМ развиваются аутоиммунные реакции гуморального типа к нейроспецифическим белкам группы S-100. Разницы в частоте обнаружения АТ-S-100 в зависимости от тяжести не было получено ($P > 0,05$). При обследовании больных ВМ и ВМЭ/ВЭ частота выявления АТ-S-100 в сыворотке крови в остром периоде заболевания была выше в сравнении со здоровыми лицами среди больных тяжелыми формами ВМЭ, среднетяжелыми формами ВМ ($P < 0,05$). В периоде реконвалесценции АТ-S-100 выявлялись ($P < 0,05$) чаще во всех группах обследованных больных (см. табл.1).

Различий в частоте обнаружения АТ-S-100 в сыворотке крови в остром периоде ВМ и ВМЭ/ВЭ в зависимости от тяжести не было обнаружено ($P > 0,05$).

Не смотря на клиническое выздоровление и санацию СМЖ, у больных ВМ и ВМЭ в периоде реконвалесценции продолжали определяться АТ-S-100 в сыворотке крови, и даже отмечалась тенденция к увеличению частоты их выявления. Можно полагать, что сохраняющиеся АТ-S-100 в периоде реконвалесценции могут участвовать в формировании резидуальных изменений (снижение памяти, интеллекта, эмоциональная лабильность и т.д) после перенесенных менингитов и менингоэнцефалитов, поскольку в формировании этих функций головного мозга непосредственное участие принимают белки группы S-100.

Мы проанализировали частоту выявления АТ-S-100 в различные сроки заболевания. Среди больных ОБМ, ВМ, ВМЭ/ВЭ в ранние сроки заболевания АТ-S-100 определялись у 20,0±5,96% пациентов. Это может говорить о вторичном иммунном ответе. Максимальная частота выявления антител к белкам группы S-100 в сыворотке крови у больных бактериальными и вирусными менингитами, менингоэнцефалитами/энцефалитами наблюдается на третьей неделе от начала заболевания.

Представлялось интересным изучить, имеется ли взаимосвязь между затяжным течением менингитов и менингоэнцефалитов и наличием АТ-S-100 в сыворотке крови. Среди всех обследованных у 20 (17,0±3,46%) больных отмечалось затяжное течение заболевания. Из них АТ-S-100 выявлялись в сыворотке крови у 15 (75,0±9,68%). Это чаще в сравнении с больными с острым те-

чением менингитов и менингоэнцефалитов (30,6+4,66%) ($P<0,001$).

Таким образом, нами разработан экспериментальный иммуноферментный набор для определения антител к нейроспецифическим белкам группы S-100, где в качестве покрытия твердой фазы использовали антигенактивные белки S-100, элюируемые с анионообменного носителя при 0,1М NaCl. При менингитах и менингоэнцефалитах развиваются аутоиммунные реакции гуморального типа к нейроспецифическим белкам группы S-100. Максимальная частота выявления антител к белкам группы S-100 в сыворотке крови у больных бактериальными и вирусными менингитами, менингоэнцефалитами/энцефалитами наблюдается на третьей недели от начала заболевания.

При затяжном течении менингитов и менингоэнцефалитов чаще выявляются антитела к белкам группы S-100 в сыворотке крови ($P<0,05$), что говорит об участии аутоиммунных реакций в патогенезе тяжелых форм менингитов и менингоэнцефалитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полетаев А.Б. Мозгоспецифические белки группы S-100, их эндогенные акцепторы и лиганды и регуляция метаболических процессов в нервной ткани: Дис. ... д-ра биохим. наук: 03.00.04.- Москва, 1987.- 228с.
2. Evaluation of tumor marker S-100 in cerebrospinal fluid from subjects with nonischemic brain pathologies. J.R. Infante, M. Torres-Avisbal, A. Martinez e.a. // Tumour Biol.- 2000.- Vol.21, №1.-P.38-45.

3. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. T. Buttner, S. Weyers, T. Postert, R. Sprengelmeyer, W. Kuhn // Stroke.- 1997.- Vol. 28, №10.-P.1961-1965.
4. Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. H. Rosen, L. Rosengren, J. Herlitz, C. Blomstrand // Stroke.-1998.- Vol. 29, №2.-P.473-477.
5. Comparison of serial S-100 and NSE serum measurements after severe head injury. C. Woertgen, R.D. Rothoerl, M. Holzschuh, C. Metz, A. Brawanski. // Acta. Neurochir. Wien.- 1997.-Vol.139, №12.-P.1161-1165.

РЕЗЮМЕ

Получены отдельные фракции белков группы S-100 и выявлена фракция с наибольшей антигенной активностью, на основе которой разработан экспериментальный иммуноферментный набор для определения антител к белкам группы S-100. Выявлено наличие антител к белкам группы S-100 у больных бактериальными и вирусными менингитами и менингоэнцефалитами и показано, что частота обнаружения АТ-S-100 определяется течением заболевания.

SUMMARY

The separate fractions of S-100 group protein are obtained and the fraction with the greatest antigenic activity is revealed. We developed variant of indirect enzyme immunoassay for determination of the proteins of group S-100. The antibodies to proteins of group S-100 among the patients with bacterial and viral meningitis and meningoencephalitis were detected more often than among the healthy persons ($P<0,05$). The frequency of detection of antibodies to proteins of group S-100 is determined by current of disease.